

IMMUNOPANDORA

ofwel

DE ONTWIKKELING VAN DE TOEGEPASTE IMMUNOLOGIE

Rede

in verkorte vorm
uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van
bijzonder hoogleraar in de Immunotechnologie
aan de Faculteit der Geneeskunde
en Gezondheidswetenschappen
van de
Erasmus Universiteit te Rotterdam
vanwege het Lorentz-Van Iterson Fonds
op 4 juni 1992

door

Dr. J.J.Haaijman

Mijnheer de Rector Magnificus,
Dames en heren,

De strijd tussen de micro- en de macrowereld

Zoals wij hier zitten worden we van moment tot moment belaagd door een groot aantal micro-organismen die ons binnen de kortste keren zouden reduceren tot een sappige voedingsbodemp, ware het niet dat we voorzien zijn van een (meestal) adequaat functionerend afweersysteem: het immuunsysteem.

Het aantal microorganismen dat zich op onze huid en in ons maag-darmkanaal bevindt is vele malen groter dan het totaal aan cellen van ons eigen lichaam. Normaal hebben we daar geen last van, totdat er tussen deze biljoenen cellen een variant sluipst waar we geen verweer tegen hebben. Alle rust is voorbij en we duiken in bed met hoge koorts en een uiterst onprettig gevoel. We zijn ziek. We worden verzorgd door mensen die in principe hetzelfde afweersysteem bezitten als wijzelf, maar die lang niet altijd ook ziek behoeven te worden. Onze afweercapaciteit is blijkbaar behoorlijk persoonsgebonden.

De afweer tegen lichaamsvreemde stoffen en cellen is een principe dat al heel vroeg in de evolutie begint. Alle afweer begint met herkenning: een organisme moet eerst 'weten' dat er een indringer is, alvorens het tot de geëigende tegenmaatregel kan overgaan. Men kan lang speculeren over het primaire evolutionaire nut van deze herkenning. Gaan we voldoende lang terug in de tijd, dan moeten we het waarschijnlijk zoeken in de stabilisering van soorten. Zonder een vorm van herkenning kruist elke soort met elke soort en wordt het een chaos. Er zijn bijzonder fraaie experimenten uitgevoerd met zeesponsen, waarbij men kon laten zien dat de ene soort zich terugtrekt van de andere soort als ze te dicht bij elkaar worden gebracht. Een andere, nog steeds niet geheel ontrafelde, vorm van herkenning is die bij planten. Waarom bevruchten éénhuizige planten niet zichzelf, maar zijn ze afhankelijk van 'vreemd' stuifmeel?

Leggen we nu het herkennen van soortgenoten even terzijde en beperken we ons tot microorganismen versus multicellulaire organismen, dan moeten we ons de vraag stellen wat de eerste - de micro's - bij de laatste - de macro's - te zoeken hebben. Het

antwoord zal iedereen duidelijk zijn: dat is bescherming. Door zijn specialisatie in verschillende celtypen voorziet het multicellulaire organisme in een broedplaats voor ééncelligen, die daar met enig vernuft voedingsstoffen vinden die ze daarbuiten niet of veel moeilijker kunnen bereiken. Hoe meer het multicellulaire organisme zich afsluit van zijn omgeving, des te meer afweer het nodig heeft om indringers buiten te houden. Dit is prachtig te volgen in de evolutie. Er zijn twee belangrijke breekpunten aan te geven: het verhuizen van de zee naar het land en het omschakelen van koud- naar warmbloedigheid.

Water speelt een alles overheersende rol in het leven. Bacteriën en olifanten strijden beide om het hardst om voldoende water vast te houden. Op het land wordt de aanval van microorganismen verhevigd en wordt het afweersysteem complexer. Hetzelfde geldt ongeveer voor de overgang van koud- naar warmbloedigheid: zoals bekend vermenigvuldigen de meeste bacteriën zich aanzienlijk sneller bij verhoogde temperatuur, dus moet de potentiële gastheer zich veel beter wapenen tegen deze overmacht.

In het voorgaande is een duidelijke competitie geschetst tussen één- en meercellige organismen. Dit is slechts een deel van het verhaal: beter ware het misschien de relatie tussen micro's en macro's te beschrijven als een gewapende vrede. Wee het micro-organisme dat ongelimiteerd groeit en daarmee zijn gastheer aan de rand van de afgrond of daaroverheen brengt. Hij verliest direct zijn bron van voedingsstoffen en is evolutionair gezien niet echt opgeschoten. In dit licht moeten pathogene microorganismen dan ook als nieuwkomers gezien worden die nog niet de regels van het spel begrijpen. Anderszins hebben de macro's de micro's ook nodig. Iedereen is vertrouwd met het begrip symbiose waarbij gast en gastheer wederzijds profiteren. De vitamine B pil die U krijgt na een agressieve antibiotica behandeling waarbij de darmflora van streek is gebracht, geeft wel aan hoe afhankelijk we geworden zijn van onze darmbacteriën, die overigens denigrerend betiteld worden als commensalen, de meeters. Tegen onze commensalen doen we niets. Dat ligt anders bij pathogenen die ons het leven zuur maken: daar treden we met harde hand tegen op. Al het afweergeschut wordt in stelling gebracht om ervoor te zorgen dat zij niet de overhand krijgen. Hoe weten we wie de vijand is en wie niet?

In deze voorbeelden wordt het beeld opgeroepen van specifieke herkenning als basis van een afweersysteem. Dit is maar een gedeelte van de waarheid. Voor een groot gedeelte is de afweer van ons lichaam niet-specifiek. Dit begint met de fysieke bescherming tegen het binnendringen van stoffen en cellen. Onze huid is dik en vet en houdt de meeste ééncelligen tegen. Gevaarlijker ligt het bij onze ademhalings- en spijsverteringswegen. Hier moe(s)t een delicate balans gevonden worden tussen bescherming tegen micro's en de doorlaatbaarheid voor zuurstof, respectievelijk voedingsstoffen.

Voor de ademhalingswegen werd gekozen voor een systeem van zich steeds verder vertakkende bronchiën en bronchioli, waarvan de wandcellen voorzien zijn van trilharen die de overvloedig geproduceerde mucus naar buiten werken. De meeste micro's worden in de mucus gevangen en verwijderd. Experimenten laten zien dat de kans, dat een bacterie het werkelijke gaswisselingsbed bereikt, uitermate gering is. De oplossing voor het spijsverteringskanaal werd gevonden in een combinatie van meerlagig epitheel zoals in de slokdarm, een zuurval in de maag en nauw aaneengesloten dekcellen in dunne en dikke darm. Bij de mens is de wand van de slokdarm voorzien van uitbundige secretoire activiteit en vervult de uitgescheiden mucus eenzelfde functie als in het neus- of bronchusepitheel. Bij de muis is dit niet het geval en is de slokdarm uitsluitend mechanisch beschermd. Dit geeft al aan dat de natuur verscheidene oplossingen voor hetzelfde probleem heeft weten te vinden.

Dringt een micro door de eerste verdedigingslinie heen, dan ontmoet het een leger van alles-eters, de macrofagen. Deze stofzuigen alles op wat langs komt. Sommige macrofaagpopulaties fungeren als boodschappercellen. Zij gaan aan de wandel met hun verteerde indringers en laten de resten zien aan de cellen van het specifieke afweersysteem, het immuunsysteem. Alle lichaamsvreemde stoffen noemen we antigeen en alles waartegen het immuunsysteem reageert noemen we immunogeen. Niet alle binnendringers worden door de macrofagenlinie onderschept. Dit kan verschillende oorzaken hebben die òf te maken hebben met de eigenschappen van de indringer, òf met die van het immuunsysteem zelf.

Onder normale omstandigheden zal het immuunsysteem slechts reageren op lichaamsvreemde cellen en stoffen. Het onderscheid tussen zelf en niet-zelf is één van de meest intrigerende kernbegrippen van de immunologie. Nog steeds is het mechanisme waarmee dit onderscheid tijdens de ontwikkeling van een individu wordt vastgelegd maar globaal bekend. Collega Van Ewijk heeft drie weken geleden vanaf deze plaats een stuk van de sluier opgelicht en vooral de rol van persoonsgebonden combinaties van weefselantigenen uit het 'major histocompatibility complex' (MHC) naar voren gebracht. Hij heeft daarbij ook aangegeven dat nog veel onbekend is over de finetuning van het systeem. Het zou mij niet passen om daar nu verder op in te gaan.

Aan de basis van de immunreactie ligt de moleculaire herkenning van het antigeen. Die moleculaire herkenning wordt aan de kant van het immuunapparaat verzorgd door eiwitten. Door hun opbouw uit 26 verschillende bouwstenen, de aminozuren, vormen eiwitten structureel gezien de meest diverse groep van moleculen die de natuur kent. Eiwitten zijn in staat om een interactie aan te gaan met een veelheid aan moleculaire structuren. Interactie of associatie betekent nog geen herkenning. Hier- van is - in het kader van deze voordracht - pas sprake als er na de associatie ook een blijk van herkenning wordt gegeven in de vorm van een vervolgreactie.

Het immuunsysteem

Voordat we ons verder kunnen verdiepen in de toepassing van immunologische principes door middel van de immunotechnologie is het nodig u eerst een 'bird's eye view' te geven van het functioneren van het immuunsysteem.

Zeer globaal bestaat het immuunsysteem uit een antigeenpresenterend, een regulerend en een effector compartiment. Met het antigeenpresenterende compartiment hebben we reeds kort kennis gemaakt in de vorm van wandelende macrofagen. De functie van antigeenpresenterende cellen ligt in hun naam besloten: zij nemen antigenen op, modifieren die met behulp van enzymen en transporteren de brokstukken naar hun oppervlak, alwaar deze 'gezien' kunnen worden door andere leden van het immunologische gezelschap. De belangrijkste daarvan behoren tot het regulerend compartiment en zijn de zogeheten T-helpercellen. T-helpercellen behoren tot de witte bloedlichaampjes, de lymfocyten. De 'T' staat voor Thymus, het orgaan dat deze cellen produceert.

Klassiek worden binnen het effector-compartiment de cellulaire en humorale arm onderscheiden. De cellulaire arm wordt ook ingevuld door T-cellen. Deze zijn onder meer in staat een vertraagd type overgevoeligheidsreactie te verzorgen en een cytotoxische reactie (het doden van andere cellen door middel van direct cel-cel contact).

Na activatie van T-helpercellen door antigeenpresenterende cellen komt een cascade op gang, gericht op het activeren, prolifereren en differentiëren van de belangrijkste andere klasse van lymfocyten, de B-cellen, die behoren tot het humorale effector-compartiment. De 'B' staat voor de Bursa van Fabricius, het orgaan bij vogels waar deze cellen in pure vorm gemaakt worden. Bij zoogdieren is de belangrijkste vormingsplaats het beenmerg, dus die 'B' kwam nog niet zo slecht uit.

Onder invloed van signaalstoffen (cytokinen) van de T-helpercellen gaan B-cellen delen. Zij vormen een zogenaamde clone. Een clone is een verzameling identieke cellen afkomstig uit één voorlopercel. Na de delingsfase volgt de rijpingsfase, waarbij de B-cel een grote eiwit-synthetiserende capaciteit opbouwt om tenslotte te eindigen als een volwassen plasmacel die grote hoeveelheden antilichaam uitscheidt. De geproduceerde antilichamen blijken specifiek te reageren met het antigeen dat de oorzaak van het hele proces was.

De vraag is dan natuurlijk direct of het antigeen de vorming van het specifieke antilichaam heeft gestuurd, of dat de B-cel al van tevoren was geprogrammeerd om dat ene antilichaam te maken. Lange tijd heeft de discussie tussen de inductionisten en de selectionisten in de immunologie gewoed om tenslotte in het voordeel van de

laatste te eindigen. Individuele B-cellen krijgen tijdens hun ontwikkeling een specificiteit mee die zich uit in de produktie van een kleine hoeveelheid antilichaam dat als receptor op de membraan fungeert. Het membraan-gebonden antilichaam is gelijk aan het antilichaam dat uiteindelijk na activatie en differentiatie door de plasmacel wordt geproduceerd behalve dat het voorzien is van een hydrofobe staart waarmee het in de membraan wordt verankerd.

In principe is ons lichaam voorzien van B-cellen die alle mogelijke antigenen en antigene structuren kunnen herkennen. Ik zeg hier met nadruk antigene structuren, omdat een antilichaam slechts onderdelen 'ziet', van beperkte omvang. Deze beperking wordt opgelegd door de omvang van de antigeen-bindingsplaats, waarover zo direct meer.

Gaan we uit van het model dat het lichaam B-cellen bevat met een specificiteit voor een oneindige variëteit aan kleine onderdelen van moleculen, dan zal het U niet verbazen dat een 'normaal' antigeen een veelheid aan verschillende antilichamen oproept.

Eén van de meest illustratieve bewijzen hiervoor wordt geleverd door een methode die wel de PEPSCAN wordt genoemd. Deze is ontwikkeld door Geysen toen hij gast was op het Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI) te Lelystad en die door collega Meloen is uitgewerkt tot een algemeen bekend hulpmiddel in de immunologie. De idee van de PEPSCAN is eenvoudig: gegeven een eiwit waarvan de aminozuurvolgorde bekend is. Gegeven ook het feit dat antilichamen delen van eiwitten herkennen met een omvang in de orde van 6 tot 8 aminozuren. Maak dan een set van octopeptiden, waarvan de aminozuurvolgorde correspondeert met die van het eiwit waarin men is geïnteresseerd en waarbij de volgorde steeds één aminozuur verspringt. Dus octopeptiden met de aminozuurvolgorde 1 t/m 8, 2 t/m 9, 3 t/m 10, enz. Er ontstaat dus een set van overlappende (kleine) peptiden die tezamen de complete volgorde van het eiwit representeren. Ontwikkel vervolgens een methode om de associatie van antilichamen met deze peptiden te kunnen vaststellen. Neem daarna serum van een dier dat of mens die in aanraking is gekomen met het bewuste eiwit en ga na welke eiwitonderdelen door dat serum herkend worden. In vrijwel alle gevallen vindt men meerdere delen van het eiwit waarvan de corresponderende peptiden een reactie geven. Terugvertaald naar het eiwit spreekt men van antigene determinanten of epitopen die door antilichamen herkend worden. Dit klinkt allemaal relatief eenvoudig, maar ik kan u verzekeren dat achter dit resultaat een geweldige technische inspanning heeft gelegen, waarvoor de collega's van het CDI veel eer toekomt.

We gaan dus nu uit van B-cellen met een specificiteit voor kleine onderdelen van antigenen, de epitopen, en moeten ons de vraag stellen op welke wijze het lichaam

voorziet in deze veelheid aan B-cellen en specificiteiten. Bevat ons erfelijk materiaal, het DNA, de informatie voor al deze specificiteiten, of worden zij op de één of andere wijze - door bij voorbeeld mutaties - gevormd uit een standaard specificiteit? Om deze vraag te beantwoorden moeten we ons verder verdiepen in de structuur van antilichamen.

Antilichamen

Het onderzoek naar de structuur van antilichamen is onverbrekkelijk verbonden met de namen van Edelman en Porter. Zij maakten gebruik van sera van patiënten die lijden aan de ziekte van Kahler, of anders genoemd, multipel myeloma. Deze ziekte bestaat uit een kwaadaardige woekering van plasmacellen en het serum wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een overmaat aan zogeheten gamma-globulinen.

De naam gamma-globuline stamt uit de tijd dat men begon serum te onderzoeken met behulp van electroforese. Wordt serum in een elektrisch veld gebracht, dan blijkt het verschillende componenten te bevatten waarvan een aantal naar de anode lopen en dus negatief geladen zijn en een aantal naar de kathode bewegen. De anodische eiwitten werden alfa- en beta-globulinen genoemd en de kathodische gammaglobulinen. Normaal serum geeft een wazige band in het gamma gebied, terwijl sera van myeloompatiënten daar een zware scherpe band laten zien. Voor verschillende patiënten liggen die banden op verschillende plaatsen, afhankelijk van de lading van het betreffende eiwit.

De eiwitten uit het gammagebied konden verder worden onderscheiden door een techniek dat bekend staat als de immunoelectroforese. Deze techniek maakt gebruik van antisera. Antisera worden verkregen van dieren die opzettelijk in aanraking worden gebracht met antigeen. We maken hierbij gebruik van het natuurlijke vermogen van dieren om zich te verweren tegen soortvreemde stoffen en zitten dan meteen midden in de immunotechnologie. Op de bereiding en het gebruik van antisera kom ik straks uitvoerig terug. Nu hebben we ze nodig om met behulp van immunoelectroforese te laten zien dat het gammagebied is opgebouwd uit een veelheid van eiwitten.

We maken hierbij gebruik van een nog niet besproken eigenschap van antilichamen, namelijk dat zij met een bepaalde hoeveelheid antigeen een precipitatiereactie vertonen. Voegt men aan een vaste hoeveelheid antiserum verschillende concentraties antigeen toe, dan ontstaat een neerslag waarvan de hoeveelheid een klokvormig verloop vertoont met de antigeenconcentratie. Deze klokvormigheid laat zich verklaren door aan te nemen dat er een meervoudige interactie nodig is tussen antigeen en

antilichaam waarbij slechts complexen van meerdere antigeen- en antilichaam-moleculen tot neerslag overgaan. Die complexen zijn alleen maar voor te stellen door aan te nemen dat antilichamen in principe met twee of meer antigeenmoleculen tegelijk kunnen reageren. Het model van een antilichaam met meerdere antigeenbindingsplaatsen was hiermee geboren. In immunologische pictogrammen wordt het antilichaam altijd uitgebeeld als een 'Y' om daarmee een tweewaardigheid aan te geven. Dat die tweewaardigheid ook een fysiek gegeven was, kon pas worden bewezen in de jaren '60 toen technieken beschikbaar kwamen om individuele moleculen zichtbaar te maken met het elektronenmicroscop.

Gaan we uit van een bolletje als antigeen en een 'Y' als antilichaam, dan kunnen we ons voorstellen dat maximale precipitatie slechts bij een vaste verhouding tussen antigeen en antilichaam plaatsvindt (het zogenoemde equivalentiepunt). Bij overmaat van zowel antigeen als antilichaam zal een gedeelte van de complexen niet de vereiste omvang bereiken om neer te slaan.

Terug naar de immuno-electroforese waarbij eerst serum onderworpen wordt aan een elektrisch veld in een agarplaatje. Zijn de eiwitten voldoende gescheiden, dan wordt een gootje gemaakt in de agar en daarin wordt antiserum gebracht. De serum- en antiserumeiwitten zullen naar elkaar toe diffunderen en neerslaan op de plaats waar het equivalentiepunt wordt bereikt. De scherpe lijnen worden verkregen doordat buiten het equivalentiepunt de complexen oplosbaar blijven en in een spoelstap verwijderd worden. Tot nu toe hebben we een antiserum gebruikt dat opgewekt was door volledig serum van een mens bij een konijn of geit in te spuiten. Een dergelijk antiserum reageert met alle componenten van het serum. Het is vanzelfsprekend dat vervolgens getracht is om antisera te maken tegen specifieke componenten uit het serum. Voor nu zijn vooral de gamma-globulinen van belang. Door gebruik te maken van de eerder genoemde myeloma sera was het mogelijk een verzameling aan te leggen van gezuiverde eiwitten. Tegen deze eiwitten zijn antisera opgewekt. Om een lang en uiterst arbeidsintensief verhaal kort te maken konden met deze antisera een aantal klassen van gamma-globulinen onderscheiden worden. Deze klassen worden aangegeven met letters voorafgegaan door de afkorting Ig die staat voor immunoglobuline. Ig's zijn een verbijzondering van gamma-globulinen en bezitten antigeenbindingsactiviteit. De naamgeving van de immunoglobulinen heeft een historische grond en doet op dit moment wat minder ter zake. We kennen de volgende klassen van Ig's: IgM, IgG, IgA, IgE en IgD.

Aan het eind van de jaren vijftig en begin zestig had men de beschikking over een aantal gezuiverde eiwitten zonder bekende structuur en zonder duidelijke functie. Reductie en alkylering lieten deze eiwitten uiteen vallen in twee moleculen, de één

met een aanzienlijk hoger moleculair gewicht dan de andere. Deze werden de zware en lichte keten genoemd.

Door gebruik te maken van enzymatische splitsing konden Edelman en Porter uit immunoglobulinen twee fragmenten maken, waarvan de één zich liet kristalliseren en de andere antigeenbinding vertoonde. Die laatste eigenschap kon slechts voor een enkel myeloomeiwit worden aangetoond, aangezien voor de meeste de antigeenspecificiteit onbekend is. Logischerwijs werden de twee fragmenten F_c en F_{ab} gedoopt.

In de laat-jaren-zestig en begin-jaren-zeventig volgde toen een monnikenarbeid, namelijk het vaststellen van de aminozuurvolgorde van diverse zware en lichte ketens. Worden de volgorden van zware en lichte ketens onder elkaar gelegd, dan valt op dat er delen zijn waarvan de volgorde min of meer constant is en delen die een grote mate van variatie vertonen (de zogenoemde hypervariabele gebieden). Kristallografie van fragmenten met een bekende antigeenbinding bracht uiteindelijk aan het licht dat de hypervariabele gebieden van zware en lichte keten samen verantwoordelijk zijn voor de antigeenbindingsplaats. Een compleet immunoglobuline molecuul bestaat uit twee zware en twee lichte ketens die onderling verbonden zijn met zwavelbruggen.

Lange tijd heeft door deze experimenten het model van sleutel en sleutelgat opgeld gedaan om de interactie tussen antigeen en antilichaam aanschouwelijk te beschrijven. Dit model leidde bijvoorbeeld tot de voorspelling dat eiwit-epitopen zich zouden moeten openbaren door kritische draaiingen en/of andere ruimtelijke structuren aan de buitenzijde van het eiwitmolecuul. Pas recent is door het werk van Rees en Winter duidelijk geworden dat de interactie tussen eiwitten en antilichamen ook kan plaatsvinden over grotere oppervlakken waaraan geen spectaculaire bijzonderheden waarneembaar zijn. De interactie vindt dan plaats door op het oog toevallige spatiëring van aminozuren die bij associatie in juxtapositie komen met aminozuren van het antilichaam. Interactie tussen 'kritische' aminozuren kan plaatsvinden door middel van Coulomb- of Van der Waals-krachten.

De zware ketens van verschillende myeloma eiwitten lieten zich onderscheiden in de klassen IgM, IgG, IgA, IgE en IgD. Op basis van aminozuurvolgorde kon voor de mens een verder onderscheid gemaakt worden in 4 subklassen van IgG en twee subklassen van IgA. Lichte ketens konden worden onderscheiden in twee variëteiten, namelijk kappa en lambda.

De genetica van antilichamen

Het laat zich eenvoudig uitrekenen dat ons DNA niet groot genoeg is om allemaal aparte genen te hebben voor alle verschillende antilichamen, om met Tonegawa te spreken: 'Too many chains, too few genes'. Momenteel vinden we dit heel gewoon, maar u moet zich voorstellen dat in die tijd nog steeds het Jacob- en Monod-dogma van één gen, één eiwit gold. Dogma's zijn moeilijk te bestrijden.

Dit dogma is ook de basis geweest van de inductietheorie in een modern jasje. Men postuleerde basisgenen voor antilichamen en nam aan dat de verscheidenheid aan antilichamen ontstond door een antigeen-gedreven mutatieproces. In soms zeer verhitte debatten werd gediscussieerd over de beperking van dit mutatieproces tot het variabele gedeelte van antilichamen. Langzaam veranderde daardoor overigens de betekenis van de c in F_c van 'crystal' in 'constant'. Met de komst van de mini-gen theorie van Kabat kwam er wat rust in het veld. Hij veronderstelde dat de hyper-variabele gedeeltes van antilichamen gecodeerd zouden liggen in een groot aantal mini-genen die op de één of andere manier verbonden zouden raken met de constante gedeeltes.

Het heeft tot de begin jaren tachtig geduurd voordat Honjo, Tonegawa en Hood het recombinatiemodel konden presenteren en bewijzen. De genetische informatie voor de zware en lichte keten van een antilichaam blijkt verspreid te liggen over twee chromosomen. Er is een gebied dat codeert voor de verschillende konstante gedeeltes (C), voor een aantal 'junctional genes' (J), voor een aantal 'diversity genes' (D) en tenslotte een gebied dat codeert voor een groot aantal genen voor het variabele gedeelte van immunoglobulinen (V-genen). De informatie voor een compleet antilichaam ontstaat door min of meer willekeurige combinatie van een V, D, J en C gen.

De combinaties worden verzorgd door een recombinatiemechanisme dat alleen actief is in de eerste fasen van de ontwikkeling van een B-cel. Vanuit de kiembaanconfiguratie worden door recombinases een willekeurig V-gen verbonden met een willekeurig D-gen en een willekeurig J-gen. Dan houdt de willekeurigheid op, want het VDJ-complex recombineert in eerste instantie altijd met de zware keten genen M en D. De hier beschreven recombinatie is een onomkeerbaar proces: tijdens de recombinatie wordt het tussenliggende DNA eruit gesneden en heeft het proces van herschikking plaats gevonden. Herschikking is verantwoordelijk voor een groot deel van de verscheidenheid die we aantreffen in antilichamen. Dit is des te meer zo omdat tijdens de koppeling van J en C extra basen toegevoegd of weggesneden kunnen worden met hulp van het nucleotidyl transferase enzym. Dit proces van 'junctional diversity' lijkt 'random' te geschieden. Het houdt wel in dat slechts 1 op de 3 J-C

combinaties een bruikbaar leesraam zal opleveren. Na een zeer actieve periode in de eerste stadia van de B-cel differentiatie worden de recombinases en nucleotidyl transferases afgezet en rijpt de B-cel uit.

Voor het membraan immunoglobuline wordt een supertranscript gevormd van VDJ $\mu\delta$ (waarbij μ en δ staan voor de constante delen van IgM en IgD) dat door 'splicing' twee 'messengers' oplevert voor IgM en IgD. Beide Ig's worden op de membraan van de B-cel gezet en hebben per B-cel identieke variabele gedeelten en dus antigeenbindingsactiviteit. Het is duidelijk dat het IgM als antigeenreceptor fungeert. De precieze functie van IgD is ondanks een flink aantal theorieën nog steeds niet duidelijk.

Eén B-cel bezit altijd maar één combinatie van V, D, J en C voor de zware keten en één voor de lichte keten en bezit dus maar één antigeenbindingsactiviteit. Deze combinatie komt op de membraan van de B-cel tot expressie en wordt na stimulering door antigeen en door middel van T-helpercellen, uitgescheiden door de plasmacel die ontstaat uit de betreffende B-cel.

Om het levensverhaal van de B-cel nu maar meteen af te maken hebben we de hulp van antigeen presenterende cellen en T-helpercellen nodig. De interleukinen (cytokinen) die door de laatste worden geproduceerd zetten de B-cel aan tot deling en tenslotte differentiatie in IgM-producerende plasmacellen. Tijdens deze ontwikkelingsgang heeft geen verdere diversificatie en/of somatische mutatie in het V-gedeelte plaats. Wel is het mogelijk dat de B-cel gebruik gaat maken van andere C-genen. Dit proces wordt samengevat onder de term 'switching'. 'Switching' vindt relatief laat tijdens een immuunrespons plaats en volgt normaal gesproken de volgorde van de C-genen op het DNA. Switching is ook een vorm van recombinatie gevolgd door excisie maar wordt niet vergezeld van transferase activiteit. De antigeenbinding van switchers is identiek aan die van het oorspronkelijke IgM. Het excisieprincipe sluit 'backswitching' uit, dat wil zeggen een IgM kan wel 'switchen' naar IgG1 of IgA maar niet terug. Dat dit model niet alle feiten dekt, zullen we straks zien.

Dit is misschien de plaats om één van de meest in het oog springende karakteristieken van het immuunsysteem aan de orde te stellen en dat is het geheugen. Iedereen is vertrouwd met dit begrip waarop het principe van de vaccinatie berust. Het afweersysteem reageert sneller en feller als het voor de tweede keer in aanraking komt met een antigeen. Geheugen laat zich het beste verklaren door selectieve expansie van antigeen-specifieke B- en T-cellen. Van deze eigenschap wordt in de immunotechnologie gebruik gemaakt voor het opwekken van antisera. Door regelmatige

prikkeling met antigeen kunnen sera verkregen worden met een hoge concentratie aan antilichamen, gericht tegen dat antigeen.

Om de secundaire reactie te verklaren is het nodig het verloop van een immuunrespons voor ogen te halen. Antigeen komt binnen en veroorzaakt een primaire reactie. Het gevormde antilichaam zal zich verenigen met een deel van het antigeen en het gevormde complex zal door macrofagen worden opgeruimd. Door het verlagen van de antigeenconcentratie zal het steeds lastiger worden om B-cellen te activeren. Alleen de B-cellen die een Ig-receptor dragen met hoge bindingsconstante voor het betreffende antigeen zullen uiteindelijk nog geactiveerd kunnen worden. In de loop van een immuunresponse treedt affiniteitsmaturing op: de antilichamen reageren steeds beter met het antigeen. Trekt men dit door, dan is begrijpelijk dat een immuunresponse langzaam dooft en eindigt met een voorraad aan B-cellen die gemiddeld een hogere affiniteit bezitten dan de B-cellen aan het begin van de respons. Komt het antigeen na verloop van tijd weer binnen, dan zal het worden herkend door deze B-cellen en volgt een secundaire respons die gekenmerkt wordt door een kortere tijdsvertraging en een hogere gemiddelde affiniteit. Bovendien zet het switchingsmechanisme eerder in zodat - alweer gemiddeld - de primaire respons meer IgM en de secundaire meer IgG bevat.

Ik heb het voorgaande met enige afstandelijkheid beschreven, alsof de natuur hier niet een mechanisme van adaptatie heeft gevonden waarbij de mens slechts ootmoedig het hoofd kan buigen.

De immunotechnologie als vakgebied

In de immunotechnologie wordt getracht immunologische principes te rationaliseren en te kwantificeren ten behoeve van het grootschalig gebruik van die principes in diagnostiek en therapie. In praktijk houdt de immunotechnoloog zich bezig met het bereiden van immunologische reagentia en de bestudering van de eigenschappen van deze reagentia in verschillende toepassingen. Uiteindelijk zal de immunotechnologie een biochemische vertaling moeten weten te vinden van de functionaliteit van immunologisch actieve stoffen op cellulair en moleculair niveau. De grootste uitdaging voor de immunotechnologie ligt in het verkrijgen van inzicht in het gedrag van biomoleculen *in vivo* en het ontdekken, en begrijpen, van de voorwaarden waaraan *in vitro* geproduceerde reagentia moeten voldoen om *in vivo* actief te zijn.

In de immunologie als wetenschap spelen antisera en antilichamen een overheersende rol voor het detecteren, lokaliseren en kwantificeren van antigenen. In het nu volgende wilde ik u meenemen door het land van de immunotechnologie aan de hand van

voorbeelden uit de praktijk en die een directe relatie hebben met mijn wetenschappelijke interesse, namelijk de immunoglobulinen (Ig's) zelf. Bezaten wij antisera die specifiek zouden reageren met de verschillende klassen en subklassen van Ig's dan zou wellicht de vraag opgelost kunnen worden waar deze (sub)klassen precies worden geproduceerd en waar ze, immunobiologisch gezien, goed voor zijn. Ook zouden dat soort antisera mogelijk kunnen worden gebruikt bij het volgen van immuunreacties *in vivo* en zouden afwijkingen in het normale patroon opgespoord kunnen worden.

Vóór de tweede helft van de jaren zeventig was het maken van antisera tegen immunoglobulinen een kunst die slechts aan weinigen was voorbehouden. Het kwartet dat mij in deze geheimen wijdde moet hier met respect en warmte genoemd worden: allereerst mijn promotor Willy Hijmans, dan Riek Schuit, Jirka Radl en Jules Snoijink. Het proces van antiserum-bereiding begon met het zuiveren, tot een zo hoog mogelijke graad, van de antigenen. Een deel van die antigenen werd gebruikt voor het opwekken van antisera, een ander deel voor het maken van kostbare antigeenkolommen. Immunoglobulinen zijn grote moleculen met vele epitopen. Sommige epitopen worden gedeeld door een aantal of alle klassen en subklassen, andere zijn specifiek voor een gegeven (sub)klasse. Als antigeen leveren Ig's een zeer complex antiserum op.

Gebruikt men complete immunoglobuline moleculen om te immuniseren, dan zal er een antiserum ontstaan met een grote complexiteit: het zal antilichamen bevatten tegen misschien wel honderd verschillende epitopen die zich bevinden op de zware keten en de lichte keten. Tot nu toe hebben we epitopen geïntroduceerd als lineaire stukjes eiwit met een zekere aminozuurvolgorde. U kunt zich direct voorstellen dat door vouwing van een eiwit ook aminozuren die lineair ver van elkaar verwijderd zijn in de ruimte dichtbij elkaar kunnen komen te liggen en op die wijze een zogeheten conformationele of vorm-epitop zullen kunnen vormen. Door de verknoping van zware en lichte ketens kunnen bijvoorbeeld epitopen ontstaan die gevormd worden door delen van de beide ketens. Deze epitopen gaan verloren na reductie en alkylering.

Gegeven een complex mengsel van antilichamen pastte men immunoabsorbtie toe om tot een gezuiverd produkt te komen. Bij immunoabsorbtie worden antigenen in onoplosbare vorm gebracht door koppeling aan bolletjes. Van deze preparaten kunnen kolommen worden gegoten, waarover men vervolgens antisera laat lopen. Antilichamen gericht tegen het antigeen op de kolom zullen selectief binden en worden verwijderd uit het antiserum. Zorgvuldige keuze van verschillende kolommen leidt dan uiteindelijk tot een antiserum waaruit de meeste storende specificiteiten zijn verdwenen. Vraag is vervolgens of het antiserum een specifieke reactie vertoont. Dit laat zich slechts testen indien substraten beschikbaar zijn van bewezen zuiverheid. Conceptueel is een groot probleem dat de meest gevoelige methode voor het

aantonen van antigeenzuiverheid bij grotere eiwitten meestal berust op het gebruik van antisera. Voor dat men het weet, draait men in een cirkel rond.

In het geval van de immunoglobulinen komt de natuur te hulp. We stelden reeds vast dat plasmacellen slechts één (sub)klasse van Ig en slechts één klasse lichte keten maken. Voor menselijke Ig's vormt beenmerg van zowel normalen als van patiënten met de ziekte van Kahler een ideaal testsubstraat. Voorop staat natuurlijk dat men een methode heeft om de binding van antilichaam aan antigeen zichtbaar te maken. Fluorescerende 'labels' zijn hierbij het meest populair en het is aan onze landgenoot Ploem te danken dat er fluorescentiemicroscopen op de markt kwamen waarmee, met hoge graad van perfectie, meerdere 'labels' tegelijkertijd gebruikt konden worden.

'Performance testing'

Het is zonder twijfel de verdienste van Hijmans geweest dat hij het concept van de 'performance testing' heeft geïntroduceerd. Daarmee wordt bedoeld dat de werkzaamheid en specificiteit van een antiserum bezien wordt onder precies dezelfde omstandigheden als waaronder het later exploratief toegepast gaat worden. Dat dit geen overbodige luxe is, werd bewezen aan de hand van een groot aantal voorbeelden waarbij antisera alle biochemische en immunochemische specificiteitstesten hadden doorstaan maar desondanks grote kruisreactiviteit vertoonden op cellulair niveau. Dat het concept van 'performance testing' nog volledig actueel is, hoop ik u zo meteen te bewijzen.

Hoewel de traditionele methode schitterende en krachtige antisera heeft opgeleverd kan men zich het verlangen voorstellen naar een volledig homogeen en constant antilichaampreparaat. Elke traditionele antiserum 'batch' is in principe uniek en eindig. Steeds weer opnieuw moet men door het lange en moeizame proces van zuivering en kwaliteitscontrole. We hebben gezien dat de afstammelingen van één B-cel, een clone van plasmacellen levert die slechts één soort immunoglobuline moleculen maakt. Zou het mogelijk zijn om één B-cel of plasmacel te vermenigvuldigen en in zulke hoeveelheden te kweken dat het produkt in de vorm van een monoclonaal antilichaam verzameld kan worden?

In 1975 kwam de publikatie van Köhler en Milstein, die liet zien dat fusie tussen een B-cel en een plasmacytomacel mogelijk was, met behoud van de eigenschap van de B-cel tot antilichaamvorming en die van de plasmacytomacel tot oneindige deling. Monoclonale antilichamen zijn nu deel van ons dagelijks leven geworden en dat doet wel eens vergeten wat voor een geniale vinding dit is geweest, en wat voor immense moeilijkheden Köhler en Milstein hebben moeten overwinnen om tot een dergelijk

resultaat te komen. Het is misschien illustratief dat de meest gebruikte fusiepartners van dit moment zijn afgeleid van de lijn die Milstein isoleerde.

Monoclonale antilichamen

Door fusie van een antigeen-gestimuleerde B-cel en een speciale kankercel ontstaat een hybridomacel die in principe een oneindige bron van antilichaam is. De techniek van het maken van monoclonale antilichamen met muizen of ratten als leverancier van gestimuleerde B-cellen, is reeds genoegzaam beschreven. Hier wordt volstaan met het aangeven van een aantal uitgangspunten die hun nut in praktijk bewezen hebben.

- (1) Tracht nooit monoclonale antilichamen (Mab's) te maken tegen antigenen waar u onvoldoende vanaf weet. Karakteriseer uw testsystemen grondig met polyclonale antilichamen alvorens u begint met het fuseren.
- (2) Test uw Mab's altijd in het systeem dat u later gaat gebruiken in uw exploratieve onderzoek en bedenk kritische controles waarmee vast te stellen valt dat het Mab de werkelijke specificiteit heeft die u ervan verwacht.
- (3) Houdt voortdurend voor ogen dat een Mab moleculaire structuren herkent die gevoelig zijn voor elke behandeling waaraan u het antigeen onderwerpt. Een positieve reactie onder gegeven omstandigheden garandeert op geen enkele wijze een positieve reactie onder andere omstandigheden.
- (4) De binding van een Mab aan een gegeven antigeen zegt niets over de mogelijke fysiologische betekenis van die binding.
- (5) Bij het begrijpen van de onderlinge verhouding tussen celtypen dient de normale weefselarchitectuur nooit uit het oog verloren te worden.

De techniek

Voordat we verder ingaan op de mogelijkheden en onmogelijkheden van monoclonale antistoffen eerst een korte beschrijving van de techniek. Basis vormt een plasmacytomacellijn die goed in celkweek is te houden. De moderne fusieline maakt van zichzelf geen immunoglobulinen en bezit een selectiemarker. De tweede belangrijke partner is de geactiveerde B-cel die verkregen wordt door immunisatie. Het merendeel van monoclonale antilichamen (Mab's) wordt nog steeds met muizen verkregen. Op het juiste moment na immunisatie worden milt- of lymfekliercellen verzameld en

gemengd met de plasmacytoma-cellen in de aanwezigheid van een fusogeen agens, in de meeste gevallen polyethyleen glycol (PEG). Het mengsel wordt vervolgens na goed wassen verder gekweekt in een selectiemedium. Er zijn in de loop der tijd verschillende selectieprocedures geprobeerd die gemeen hebben dat de miltcel het defect van de plasmacytoma-cel complementeert. Dit betekent dat alleen fusanten in het selectiemedium zullen overleven. B-cellen op zich zijn niet levensvatbaar onder de gebruikte omstandigheden en sterven vanzelf af.

Resultaat is tenslotte een tumorcel die *in vitro* een antilichaam naar keuze maakt. In principe kan de tumorcel oneindig doorgroeien en onbegrensde hoeveelheden antilichaam produceren. Ik ga u niet vermoeien met alle technische details die komen kijken bij het maken van Mab's. Zij zijn uitvoerig in artikelen en verschillende handboeken terug te vinden. Tussen haakjes, het heeft zeker tot midden-jaren 80 geduurd voordat de Mab techniek uit de sfeer van de kunst kwam. Ontelbaar zijn de artikelen uit die periode met alleen de boodschap, dat de schrijvers ook in staat waren geweest een Mab te produceren.

Mijn eerste monoclonaal maakte ik in 1979 tijdens mijn verblijf aan de Stanford University in de groep van Herzenberg. Er heerste in het lab van Herzenberg een sfeer die het beste te vergelijken was met de goldrush. Voor allerhande immunologisch belangrijke antigenen waren Mab's nodig en het was een kwestie van geluk en oogsten. Mijn voorstel aan Herzenberg was oorspronkelijk geweest om te gaan zoeken naar Mab's tegen Ly-1 en Ly-2, twee belangrijke T-cel oppervlakte-antigenen die in de pre-Mab era gekarakteriseerd werden met behulp van alloantisera, dit zijn antisera opgewekt door het immuniseren van muizen met cellen van genetisch verschillende muizen. Toen ik aankwam in Stanford was jammer genoeg de goldrush zijn gang gegaan en had Jeff Ledbetter de Mab's reeds in handen. Geen nood, er was nog meer te doen. De Herzenbergs hadden een wereldnaam op het gebied van de suppressorcellen. Samen met McDevitt hadden zij een serum ontwikkeld dat specifiek was voor het MHC locus I-J, het suppressorlocus. Anti-I-J was in staat om *in vitro* bepaalde deelpopulaties van nylon wol geselecteerde T-cellen te verwijderen, waardoor ze beter in staat waren om B-cellen te helpen. Als beginnende Mab fanaat kreeg ik 50µl van dit kostbare antiserum en een flesje met cellen die I-J positief waren bevonden. Afgezien van het feit dat ik dat positieve resultaat nooit heb kunnen reproduceren, leverde fusies met deze bijzondere cellijn een Mab op gericht tegen Thy-1 een algemene T-cel-merker. Tot mijn begrijpelijk genoeg wordt dit anti-Thy-1 nog steeds gebruikt, bijvoorbeeld door collega Van Ewijk.

Hoewel er meerdere artikelen zijn verschenen over het wel of niet aanwezig zijn van I-J op bepaalde celpopulaties viel in de beginjaren tachtig het doek over dit MHC antigeen, toen met behulp van recombinant DNA technieken kon worden vastgesteld

dat er binnen het klasse II gebied op het chromosomaal DNA geen plaats was voor dit geheimzinnige locus. Het is overigens een onderwerp waarop binnen Stanford niet graag wordt teruggekomen!

De moraal van dit verhaal is dat het gevaarlijk is om achter Mab's aan te gaan zonder voldoende voorkennis van het antigeen en zonder een waterdichte test voor het selecteren van eventuele clones. U moet zich daarbij voorstellen dat een fusiemengsel in principe een groot aantal clones bevat, dit zijn dus fusanten tussen individuele B-cellen en plasmacytomacellen. Zou men dit mengsel in zijn geheel gaan kweken, dan ontstaat een polyclonaal mengsel waarmee verder weinig aan tevangen valt. Op grond van ervaring wordt het fusiemengsel daarom verdeeld over een bepaald aantal microcultures. Het aantal moet zo groot zijn, dat de kans dat meerdere clones in één microculture terecht komen bijvoorbeeld kleiner dan 10% is. Clones voor verdere expansie worden geselecteerd door in de bovenstaande kweekvloeistof van individuele microcultures te gaan zoeken naar antilichaamactiviteit met de gewenste specificiteit. Hoe had ik in mijn I-J experiment de aanwezigheid van de gewenste activiteit kunnen aantonen? Ook hier geldt het oer-Nederlandse gezegde 'bezint eer ge begint'. Voor een succesvol Mab experiment is in eerste instantie kennis van het antigeen nodig en voorts een goed gevalideerd testsysteem.

Het duurde niet erg lang of ik besepte dat het onverstandig was om achter spoken aan te jagen en dat ik de bakens moest verzetten. De flexibiliteit van het Amerikaanse systeem en de Herzenbergers lieten dit zonder meer toe, iets waar we in Nederland jaloers op zouden (moeten) zijn. Ik viel terug op mijn oude interesse en dat waren de immunoglobulinen zelf. Voorheen hadden Willy Hijmans, Riek Schuit en ikzelf een studie gedaan naar de distributie van de verschillende Ig-klassen over de lymfoïde organen bij de muis op diverse leeftijden. Uit dit onderzoek was naar voren gekomen dat die distributie met het vorderen van de leeftijd meer en meer een 'secondair' patroon ging vertonen. Deze resultaten lagen in het directe verlengde van het onderzoek dat Rob Benner en Adri van Oudenaren deden binnen de afdeling Celbiologie II van de Erasmus Universiteit. Op een suggestie van Hijmans bestudeerden zij de vorming van antilichamen bij de muis in de milt, de lymfeklieren en het beenmerg op verschillende tijdstippen na immunisatie met schape rode bloedcellen. De suggestie van Hijmans was gebaseerd op de waarneming dat er bij mensen een verband leek te bestaan tussen de aantallen plasmacellen van een gegeven Ig-klasse in het beenmerg en de concentratie van dat Ig in het serum. Een dergelijk verband leek niet aannemelijk te maken voor andere lymfoïde organen. Hijmans was de eerste die het beenmerg verantwoordelijk stelde als belangrijkste leverancier van serum Ig's. Benner en medewerkers konden bij de muis aantonen dat het beenmerg inderdaad de belangrijkste Ig-producent is, maar alleen na secundaire prikkeling. De eerste keer dat het immuunsysteem in aanraking komt met een antigeen reageert het

lokaal en afhankelijk van de intredeplaats van het antigeen. In de proeven van Benner et al., waarbij intraveneuze toediening van antigeen plaatsvond, was dit de milt. Wordt een muis voor de tweede keer geprikkeld met antigeen, dan ziet men eerst een felle (secondaire) reactie van de milt, die binnen een aantal dagen 'verhuist' naar het beenmerg.

De leeftijdsafhankelijke verschuivingen in plasmacellen weerspiegelen een steeds verdere betrokkenheid van het immuunsysteem bij secondaire reacties, zeer waarschijnlijk als reactie op omgevingsantigenen. De veroudering van het immuunsysteem bij muizen gaat ook gepaard met een verminderd vermogen om te reageren op primaire antigenen. Aangezien de basis van de primaire immunreactie tenminste gedeeltelijk gelegen is bij de B-cellen leek het me een goed idee om met Mab's de Igs te gaan bestuderen die voorkomen op de membraan van B-cellen. Zoals reeds eerder gezegd, zijn dit vooral de klassen IgM en IgD. Voor IgD was een Mab voorhanden gemaakt door Vernon Oi en Pat Jones. Het was specifiek voor een zo geheten allotype merker op IgD. Allotypen zijn genetisch vastgelegde verschillen in de constante gedeelten van zware en lichte ketens tussen individuen van één soort, en dus ook tussen ingeteelde muizestammen. Geselecteerde combinaties van immunoglobulinen en muizestammen leveren anti-allotype antisera op. Op basis van dit gegeven konden Oi en Jones een muis-anti-muis-IgD maken.

De expressie van IgM en IgD op muize-B-cellen

Op het moment dat ik het anti-IgM nodig had, waren de allotypen van muize- IgM nog niet éénduidig beschreven en moest uitgeweken worden naar een zogenaamde xenofusie. Hierbij immuniseert men bijvoorbeeld een rat met muize-Ig en fuseert de rattemiltcellen met een muize-plasmacytomacellijn. In het geval van rat en muis kunnen zeer stabiele fusieprodukten ontstaan. Na wat infecties en andere narigheid was ik in het bezit van een kweekvloeistof die anti-IgM antilichamen bevatte, bepaald door middel van een radio-immunoassay (RIA).

Het doel van de exercitie was het zichtbaar maken van IgM en IgD op individuele B-cellen. Hiervoor kan men enerzijds gebruik maken van de fluorescentiemicroscopie en anderzijds van de flowcytometrie. Het voordeel van de eerste is de combinatie van morfologische details en het fluorescentiebeeld. Bij flowcytometrie worden individuele cellen in ganzenmars door een laserbundel geleid. Het laserlicht exciteert de fluorochroom moleculen en de fluorescentiesignalen worden door fotovermenigvuldigbuisen opgevangen en gemeten. Door de voorwaartse en 90° verstrooiing van het primaire laserlicht te meten kan een indruk worden verkregen van de omvang en de 'ruwheid' van het celoppervlak, twee belangrijke parameters om enigszins te weten

van wat voor soort cellen de fluorescentiesignalen afkomstig zijn. Door Herzenberg als pionier en door Van den Engh en Visser in het ITRI-TNO is de flowcytometrie uitgegroeid tot een zeer geavanceerd hulpmiddel in de celbiologie. Het is nu mogelijk met meerdere fluorochromen te werken waardoor de co-expressie van twee of meer antigenen op een cel kan worden gekwantificeerd.

De binding van het anti-IgM aan B-cellen was wat teleurstellend: er was een geweldige variatie in kleuringsintensiteit tussen cellen verkregen uit de milt. Er waren zeer sterk gekleurde cellen en er was eigenlijk geen sprake van een duidelijke scheiding tussen positieve en negatieve cellen. Het leek erop alsof er een flink aantal cellen was dat maar heel weinig IgM aan hun oppervlak hadden en die moeilijk te onderscheiden waren van de achtergrond. De achtergrond in dit type experimenten wordt altijd gedefinieerd als het kleurpatroon dat ontstaat met een Mab van dezelfde Ig-klasse (als het specifieke Mab) maar met een volledig irrelevante specificiteit. Dit is misschien de plaats om een aardig technisch detail te vermelden en dat is de logaritmische versterking van fluorescentiesignalen. In het begin van de flowcytometrie werden signalen traditioneel lineair versterkt. Dit beperkt de dynamische reikwijdte van het systeem dusdanig, dat een aantal verschijnselen gemist worden. Zo ook de variatie in de expressie van IgM. Deze is zo groot dat alleen een logaritmische schaal in staat is zowel de zwakste als de sterkste signalen tegelijkertijd te accommoderen. Eerdere kleuringsexperimenten voor IgM hadden de sterkst gekleurde cellen verwaarloosd, omdat ze van de schaal afvielen. De in Stanford ontwikkelde logaritmische versterkers kwamen dus precies op tijd.

Door de kleurpatronen met anti-IgM en anti-IgD te vergelijken voor verschillende lymfoïde organen van jonge en oudere muizen werd de idee verkregen dat er een vorm van invers numeriek verband bestond tussen de IgM⁺⁺ cellen en de IgD⁺ cellen. De enige manier om hierachter te komen is het toepassen van 2-kleuren flowcytometrie.

Om een lang verhaal kort te maken, er blijken minimaal drie B-cel populaties te bestaan. Deze kunnen worden aangegeven als: IgM⁺/IgD⁺, IgM⁺⁺/IgD⁺⁺ en IgM⁺⁺/IgD⁻. Door de co-expressie van IgD worden de zwak kleurende IgM-cellen als het ware uit de achtergrond 'getrokken'. Bij hele jonge dieren en bij een speciale muizenstam, de CBA/N muis, zijn de IgM⁺/IgD⁺ cellen afwezig. Met het vorderen van de leeftijd lijken (bij normale muizen) eerst de IgM⁺⁺/IgD⁻ te ontstaan, gevolgd door IgM⁺⁺/IgD⁺ en tenslotte de IgM⁺/IgD⁺. Op deze plaats kan ik voor het eerst de onvolprezen afdeling Biotechniek van het ITRI-TNO noemen. Voor een experiment als boven beschreven is het nodig op één dag muizen beschikbaar te hebben van nauwkeurig vastgestelde leeftijden variërend tussen enkele dagen tot weken. U gelooft het niet maar dit was een opgave die de biotechniek van Stanford te boven ging en de

muizen werden ingevlogen vanuit Rijswijk, waar Joop van Hooft en wijlen Joop Westhof hun hand niet omdraaiden voor een dergelijke opgave.

De waarnemingen rond de expressie van IgM en IgD gaven aanleiding tot wilde speculaties over de ontogenetische samenhang van de drie populaties. Dit moest gevoegd worden bij het feit dat CBA/N muizen niet kunnen reageren op een bepaald soort T-cel onafhankelijke antigenen. De verklaring voor deze verwarrende informatie kwam van MacLennan en Bazin die immunocytochemie bedreven met anti-IgM en anti-IgD op coupes van de rattemilt. Zij lieten zien dat zich een populatie grote IgM⁺/IgD⁻ B-cellen bevond in de zogenaamde marginale zone van de milt. Deze cellen lijken speciaal betrokken bij de reactie op bepaalde polysaccharide antigenen en zij leiden een sessiel bestaan. Er is geen sprake van een ontogenetische relatie tussen deze cellen en de normale B-cellen; zij behoren tot twee volledig gescheiden afstammingslijnen van de hemopoëtische stamcel.

Het voorgaande geeft aan hoe voorzichtig men moet zijn bij het verwaarlozen van de informatie die besloten ligt in de weefselarchitectuur. Het is te danken aan Keuning en Langevoort dat Nederland internationaal voorop loopt in de bestudering van immunologische fenomenen *in situ* en dat alle Nederlandse immunologen ervan overtuigd zijn dat een muis meer is dan een wandelende milt. Collega Claassen van het Medisch Biologisch Laboratorium TNO heeft de *in situ* technieken sterk vervolmaakt en is in staat gebleken interacties aan te tonen tussen diverse T- en B-cel populaties die niet voorspeld konden worden op basis van *in vitro* gegevens. Het is mijn stellige overtuiging dat de immunotechnologie met name op het terrein van de *in situ* detectie van antigenen en antilichamen nog een grote bijdrage te leveren heeft. De complexiteit van het weefselverband maakt het gebruik van andere dan monoclonale antilichamen vrijwel onmogelijk.

Mab's gericht tegen menselijke immunoglobulinen

TNO is gebonden onderzoek uit te voeren dat uiteindelijk ten nutte komt van het economisch verkeer in Nederland. Het was een mengsel van oude liefde en pragmatisme die leidde tot de studie van monoclonale antilichamen gericht tegen humane immunoglobulinen. In die studie zijn hoogtepunten en dieptepunten geweest die ieder op eigen wijze bijgedragen hebben aan een beter begrip van de mogelijkheden en beperkingen van de monoclonale antilichaamtechniek.

Als basis voor het project konden we uitgaan van de jarenlange ervaring van collega Radl in het zuiveren van humane Ig's en het maken van conventionele polyclonale konijne- en geite-antisera tegen deze Ig's. Doel van onze operatie was enerzijds om de

Mab-techniek uit de sfeer van de kunst te halen en anderzijds om anti-Ig's in handen te krijgen waarmee we diagnostiek van Ig afwijkingen zouden kunnen bedrijven en ook de distributie zouden kunnen nagaan van de verschillende Ig-klassen en subklassen. Collega Van Dongen heeft drie weken geleden vanaf deze plaats laten zien tot welke verfijning de medische immunologie is gekomen, onder meer door het gebruik van monoclonale antilichamen.

IgA1 en IgA2

Het eerste doel was Mab's te verkrijgen gericht tegen klasse-epitopen, dus gericht tegen IgM, IgG, IgA, IgD en IgE. Op zuiver pragmatische gronden zijn we begonnen met IgA. Uitgangsmateriaal was een IgA2-eiwit. Ik herinner me mijn initiële teleurstelling toen bleek dat het Mab dat we opgewekt en opgewerkt hadden, alleen IgA2 herkende. Het anti-IgA2 is uiteindelijk uitermate waardevol gebleken. Het was het eerste Mab waarmee de distributie van IgA2 bevattende cellen kon worden bestudeerd en dat bovendien redelijk bruikbaar was voor het meten van IgA2-concentraties in serum en secreties. Ik ben niet onbescheiden als ik zeg dat dit Mab, samen met nog één andere, de basis heeft gegeven aan wat nu over de fysiologie van IgA2 bekend is.

Samen met een groot aantal medewerkers, waarvan ik speciaal mevrouw Deen zou willen noemen, die zich van het begin af aan met speciale toewijding op de Mab-techniek heeft gestort, waren we in staat om Mab's te verkrijgen tegen de meest gangbare epitopen. Mab's worden routinematig geselecteerd met behulp van een antigeenbindingstest. In zo'n bindingstest worden antigenen aan plastic plaatjes geadsorbeerd door middel van hydrofobe interacties. Het is niet onmogelijk dat daardoor de structuur van het antigeen verandert. Het is van het grootste belang om vervolgens het Mab te testen in de opstelling waar het later voor gebruikt gaat worden. In ons geval was dat het herkennen van Ig-bevattende cellen in diverse weefsels. Het bleek dat een positieve reactie in de bindingstest lang niet altijd voorspellend was voor een positieve reactie op weefselcoupes en het duurde niet lang of het begrip assay-specificiteit was geboren. Hiermee wordt aangegeven dat het reactiepatroon van een Mab eerst en vooral samenhangt met de wijze waarop men het toepast. In een wat poëtischer bui heb ik dat uitgedrukt als: 'The beauty of an antibody is in the eye of the beholder'. Het verschijnsel van de assay-specificiteit laat zich verklaren door te beseffen dat de reactie van een antigeen met een antilichaam afhankelijk is van de ruimtelijke presentatie van epitopen op het antigeen. Gaat men dat antigeen zuiveren, vastplakken, verhitten of anderszins fixeren, dan is de kans aanwezig dat sommige epitopen van structuur veranderen en dat daarmee de reactie met een antilichaam verloren gaat. Wee degene die een Mab kritiekloos in een assay

gebruikt zonder zich af te vragen of het Mab in die bepaalde assay wel specifiek is bevonden. Ik kan U een reeks van voorbeelden geven waarbij Mab's zich in de ene opstelling (assay) volledig anders gedragen dan in een andere opstelling. Men mag zich ook in goede gemoede afvragen hoeveel misinformatie in de literatuur is terecht gekomen op basis van dit feit.

Ik geef u één voorbeeld om het probleem te schetsen: een bepaald Mab dat was opgewekt met polyclonaal IgA, gezuiverd uit melk, reageerde in de ELISA sterk met zowel IgA1 als IgA2 en werd als een anti-IgA geklassificeerd. In de immunohistochemie (dat wil zeggen het gebruik met gefixeerde weefselcoupes) bleek het uiteindelijk alleen met IgA1 te reageren en was blijkbaar de betreffende epitop op IgA2 niet bestand tegen de behandeling met fixatief. Omdat IgA2 cellen in tonsillen, het meest gebruikte testweefsel voor dit soort monoclonalen, maar weinig voorkomen, kan een dergelijke deficiëntie vrij lang onopgemerkt blijven. Eigenlijk zal alleen tegenkleuring met een groot aantal andere monoclonalen het uiteindelijke bewijs van goed gedrag kunnen leveren.

Op grond van praktische overwegingen is het ondoenlijk om te blijven jagen op het ene Mab dat toevallig een epitop herkent die onder alle assaycondities tot expressie komt. Technisch gezien is het veruit het netste om bij Mab's precies aan te geven in welke assays ze getest zijn en op welke manier. Dit voorkomt veel teleurstellingen en vragen. Het ontslaat echter geen enkele onderzoeker van de verplichting om de specificiteit van een Mab ook in zijn of haar opstelling te controleren. Tegen deze verplichting wordt dagelijks gezondigd. Een tweede uitweg die wel gezocht wordt, is het combineren van Mab's met een onderscheiden assay-specificiteit in een zogeheten general purpose reagens. U beseft nu dat dat 'general' zijn beperkingen heeft en wel tot die assays, waarin de samenstellende Mab's van het mengsel zijn getest.

IgA is een geheimzinnig Ig. Kwantitatief is het ons belangrijkste Ig, omdat het vooral langs de darm en luchtwegen geproduceerd wordt. De dagelijkse productie aan IgA is ca 5 tot 10 maal groter dan IgG, het meest bestudeerde immunoglobuline. Om u een indruk te geven: we verliezen zo'n 10 gram IgA per dag met de stoelgang. Op zich is een dergelijke immunologische activiteit natuurlijk niet vreemd als men bedenkt dat darm en luchtwegen de belangrijkste interactieplaatsen zijn tussen antigenen en ons lichaam en als men bedenkt dat het oppervlak van darmen en luchtwegen een veelvoud is van het oppervlak bijvoorbeeld van onze huid. Bedenkt men dan ook nog dat het aantal bacteriën dat we in onze darmen met ons meedragen ongeveer een tienvoud is van het totaal van onze lichaamscellen, dan kunt u zich voorstellen dat er een massale immunologische activiteit nodig is om één en ander op orde te houden.

Het IgA dat ons aan de epheliale oppervlakken beschermt, wordt lokaal gevormd en bestaat voornamelijk uit secretoir dimeer IgA: twee IgA moleculen verbonden door een 'linker' (de J-keten) en voorzien van een accessoire eiwit, het 'secretory piece' (of 'secretory component'). Dit laatste is waarschijnlijk nodig om te voorkomen dat het dimeer IgA te snel wordt afgebroken in het proteolytische milieu van de darminhoud. Met de monoclonale anti-IgA1 en 2 was het voor het eerst mogelijk om na te gaan waar deze subklassen gevormd werden. Zeer opvallend was de gradiënt die kon worden aangetoond van proximaal naar distaal: in neusslijmvlies, slokdarm, maag en dunne darm overheerst het IgA1 terwijl in ileum en colon het IgA2 de boventoon voert. Een verklaring voor deze gradiënt is tot op heden niet gevonden, noch is bekend welke sturende factoren betrokken zijn bij de 'switching' van een B-cel naar IgA1, respectievelijk IgA2. Selectieve IgA-subklasse deficiënties verraden overigens de geweldige plasticiteit van het immuunsysteem: bij deze personen nemen de IgA-subklassen het moeiteloos van elkaar over en ontstaat geen duidelijke pathologie.

In het serum komt hoofdzakelijk de monomere vorm van IgA1 voor en maar hele lage concentraties van IgA2-, of IgA-dimeren. Het serum IgA wordt vooral in het beenmerg gevormd en mag beschouwd worden als een regulier Ig in de serie IgM, IgG, IgA. Jammer genoeg is het bij mensen bijzonder lastig om tegen 'normale' antigenen een enigszins ordentelijke IgA-respons te meten. Vanaf deze plaats wil ik hier nu niet verder op ingaan, maar u kunt zich voorstellen dat er nog veel onduidelijkheid bestaat over de rol van het monomere serum IgA, laat staan de samenhang tussen - en de differentiële regulatie van - het secretoire en het serum IgA-systeem. Anderszins kunt u zich voorstellen dat het secretoire immuunsysteem de uiterst warme belangstelling van vaccinologen heeft. Een aantal belangrijke pathogenen bereikt ons via de darm of in het algemeen de slijmvliezen. Klassiek was vaccinatie erop gericht om een zo hoog mogelijke antilichaamtiter in het serum te verkrijgen. Op geleide van deze spiegel werden vaccinpreparaten geformuleerd en de meest effectieve toedieningsroute gezocht. Simpele proeven hebben inmiddels laten zien dat de antilichaamconcentratie in het serum niet gecorreleerd is met de secretie van secretoir-IgA. In het geval van enterale of respiratoire pathogenen optimaliseert men dus op basis van een verkeerde parameter. Pas recent wordt getracht om wegen te vinden om specifieke mucosale immuniteit op te wekken. Dit is voor de immunotechnologie, waaronder ik gemakshalve ook de vaccinologie reken, één van de meest relevante werkterreinen van het komende decennium.

Om een mucosale immuniteit te verkrijgen zijn er twee majeure obstakels: (1) de niet-specifieke barrière van de macrofagen, en (2) de tendens van het mucosale systeem om de tolerantie route te kiezen. Met name particulate antigenen komen niet, of zelden, in aanraking met het mucosale immuunsysteem omdat ze door de macrofagen worden onderschept. De groep van collega Sminia van de Vrije Univer-

siteit heeft hier baanbrekend werk gedaan, alleen jammer genoeg bij knaagdieren en niet bij mensen. U zult mogelijk bij zo'n woordkeuze verbaasd zijn, maar het IgA-systeem van mensen en mensapen neemt in het dierenrijk een unieke plaats in door zijn verdeling in de monomere en dimere arm. Alle andere dieren concentreren zich op de immunobiologisch belangrijke dimere arm. Een mucosaal vaccin zal in staat moeten zijn de macrofagen om de tuin te leiden, respectievelijk zal speciale affiniteit moeten worden meegegeven voor de antigeen-transporterende cellen die de concentraties van immuuncompetente cellen rond de darm bedekken (de zgn M-cellen).

Orale tolerantie is een verschijnsel dat iedereen logisch voorkomt: het zou verwarrend zijn indien het lichaam op de veelheid van voedsel- en andere antigenen steeds zou blijven reageren. Normaal zijn wij tolerant voor alle veel voorkomende voedselbestanddelen en de samenstellende componenten van de reguliere darmflora. Het is uiterst boeiend maar nog steeds niet goed verklaard dat dit een lokale tolerantie is. Van kind af aan zijn we tolerant voor ovalbumine, een eiwit uit kippe-eieren. Aan de andere kant is het in experimentele modellen heel goed mogelijk om via parenterale immunisatie een sterke serum-IgG-respons tegen ovalbumine op te wekken met behoud van de orale tolerantie.

IgG subklassen

De IgG subklassen bleken een noot die zich aanzienlijk minder gemakkelijk liet kraken dan de IgA subklassen. Van de ca 500 monoclonale antilichamen gericht tegen IgG bleken er slechts enkele iets anders te herkennen dan een algemene IgG-epitop. In zo'n geval spreekt men van immunodominantie. Een veelheid aan slimme trucs werd bedacht om deze immunodominantie te omzeilen. Geen daarvan mocht baten. Tenslotte hebben we het opgegeven om met hele, of slinks gefragmenteerde, Ig's te blijven immuniseren, maar hebben we onze toevlucht genomen tot het zelf synthetiseren van kleine peptiden waarin de onderscheidende aminozuurvolgorden van de subklassen waren opgenomen. In die tijd waren de commerciële vaste fase 'synthesizers' net in opmars en het is aan collega Boersma, met zijn chemische achtergrond, te danken dat die machines voor ons wat bruikbaar gingen opleveren. Zonder zijn inbreng was dit nooit voor elkaar gekomen.

De eerste slag is een daalder waard en het eerste peptide leverde in één keer een bruikbaar anti-IgG3 op, dat overigens een stuk beter reageerde met warm dan met koud IgG3. Over assay-specificiteit gesproken! Daarna heeft het een hele ontdekkingsreis gekost voordat de synthetische peptide methode de volmaaktheid kreeg die hij nu heeft in de handen van de collega's van het Medisch Biologisch Laboratorium TNO.

Dat de kwaliteit van anti-IgG subklassen meer onderzoekers zorgen baarde, moge blijken uit het feit dat er een internationaal netwerk is opgezet onder auspiciën van de WHO om alle beschikbare anti-IgG's uit te wisselen en in elkaars testsystemen te vergelijken. Ik heb ooit eens uitgerekend dat aan het verkrijgen van een bruikbare set anti-IgG subklassereagentia internationaal ongeveer 100 manjaar is besteed. U zult dus begrijpen dat het mij nog steeds met vervangende trots vervult dat een aantal TNO-Mab's alle testen doorstaan heeft en bij de referentie-Mab's van de WHO behoort.

Toepassingsmogelijkheden van monoclonale antilichamen

Tot zover de anti-immunoglobulinen. Het toepassingsgebied van deze reagentia is relatief smal en het is wellicht van interesse om wat verder om ons heen te kijken. In wat voor soort wetenschapsgebieden worden Mab's zoal gebruikt? Daarbij is het nuttig een paar verschillende toepassingsmogelijkheden te onderscheiden. Traditioneel wordt het gebruik verdeeld in diagnostiek en therapie.

Eens heb ik geprobeerd een positieve lijst te maken van alle NWO wetenschapsgebieden waarin Mab's gebruikt worden voor het herkennen respectievelijk lokaliseren van antigenen. Ik heb dat snel moeten opgeven en ben er uiteindelijk toe overgegaan om de gebieden aan te geven waar ze (nog) *niet* worden gebruikt. Dit bleek een veel handzamer lijst te worden, waarop gebieden als werktuigbouwkunde en theologie figureerden. Ik probeer hiermee te zeggen dat Mab's de gehele medische wetenschap en grote delen van de biologische wetenschap hebben veroverd.

The 'magic bullet'

Voor wat betreft de therapie is de zegetocht van Mab's wat minder uitbundig geweest. Reeds in het oorspronkelijke artikel van Köhler en Milstein werd de mogelijkheid geopperd om Mab's te gaan gebruiken in het bevechten van kankercellen. Het concept van de 'magic bullet' haalde snel de populaire pers. Een 'magic bullet' bestaat uit een Mab, gericht bij voorkeur tegen een antigeen op een kankercel, voorzien van een toxische stof. Velen hebben hun beste kunnen gegeven aan het construeren van 'magic bullet's. De problemen bleken tweërlei: (1) tumorcellen dragen maar uiterst zelden specifieke antigenen, en (2) de constructie van een behoorlijk toxicon dat zijn werking beperkte tot de cellen van interesse, was een stuk lastiger dan voorzien.

Spontane tumoren bij mens en dier zijn haast per definitie niet immunogeen voor de gastheer. Zijn cellen wel immunogeen, dan zullen ze snel worden opgeruimd door het

immuunsysteem. Op deze eenvoudige stelling zijn natuurlijk uitzonderingen bekend. Dit neemt niet weg dat de meeste antigenen op tumorcellen ook op andere celtypen voorkomen. Collega Van Dongen heeft daar in zijn oratie uitgebreid op gewezen. Hij gaat er vanuit dat het fenotype van lymfoïde tumoren in principe te passen is in de normale ontwikkelingsgang van lymfoïde cellen. Eenzelfde vergelijking kan voor andere tumorsoorten gemaakt worden. Het niet-exclusieve karakter van tumor-geassocieerde antigenen behoeft niet altijd het gebruik van Mab's als 'magic bullet' in de weg te staan: in sommige gevallen is de expressie van een antigeen dusdanig uitzonderlijk, dat door secundaire beperkingen (bij voorbeeld van concentratie of van toedieningsplaats) een voldoende lokalisatiegraad verkregen kan worden.

Het monoclonale antilichaam fungeert in het 'magic bullet' concept als doelzoeker. Aangekomen bij de te doden cel moet het aangehechte toxicon zijn werk doen. Ricine mocht zich voor dit doel in de meeste populariteit verheugen. Eén molecuul van dit gif, dat uit de wortel van de aardnoot wordt gewonnen, is voldoende om een zoogdiercel te doden. Het gehele ricine molecuul is *in vivo* niet bruikbaar vanwege excessieve levertoxiciteit. Deze wordt veroorzaakt door binding via de polysaccharide-rijke beta-keten van het ricine die op zich niet toxisch is. *In vivo* werkt men met de gezuiverde (toxische) alpha-keten. Probleem is dat de alpha-keten maar heel moeizaam door een cel wordt opgenomen. De efficiëntie van celdood is maar in de orde van procenten. In de loop der tijd zijn meerdere varianten op dit thema bedacht. Andere toxicons zijn gebruikt en andere wegen zijn bewandeld om tot een betere efficiëntie te komen. Heel elegant zijn de experimenten waarbij de genetische informatie voor het constante deel van de zware ketens vervangen wordt door informatie voor bijvoorbeeld *Pseudomonas* toxine. Het is echter niet te loochenen dat de 'magic bullet' nog niet aan zijn vele verwachtingen heeft voldaan.

Immunomodulatie met Mab's

Een ander gebruik van Mab's *in vivo* is die van immunomodulator om functies van het immuunsysteem zelf te beïnvloeden. Het Mab blokkeert een celoppervlaktereceptor of complexeert een oplosbaar antigeen. Als immunosuppressiva zijn Mab's gericht tegen de CD3, CD4 en CD8 op T-lymfocyten het meest bekend geworden. Pionierswerk op dit terrein is verricht door Margreet Jonker van het toenmalige Primatencentrum, nu ITRI-TNO. In samenwerking met Mab-producenten ging zij het *in vivo* effect na van verschillende antilichamen op bijvoorbeeld de overleving van huid- en niertransplantaten bij rhesusapen. Zij maakte daarbij gebruik van het gegeven dat anti-mens monoclonale antilichamen vaak kruisreageren met rhesusaap-cellen.

Uit haar studies is gebleken dat (1) verlenging van transplantatoverleving zowel met anti-CD3, 4 en 8 kon worden verkregen, (2) dat apen een sterke immuunrespons vertonen tegen muizen Mab's, (3) dat er geen voorspellende werking uitging van *in vitro* eigenschappen van Mab's en (4) dat er afhankelijk van antigeen en Mab sprake kon zijn van coating, eliminatie of modulatie.

Onder coating verstaat men dat het Mab zich aan zijn respectievelijke doelwitantigeen op een cel bindt en dat er verder weinig gebeurt. Bij eliminatie verdwijnen de cellen waaraan zich het Mab heeft gebonden uit de circulatie waarschijnlijk door opsonisatie en complementlysis. Modulatie tenslotte is het verschijnsel dat een cel ophoudt met een gegeven antigeen aan zijn oppervlak tot expressie te brengen, maar voorts intact aanwezig blijft. Het verwarrende van mevrouw Jonker's resultaten was dat er geen causaal verband aantoonbaar leek tussen de binding van de Mab's aan T-cellen en de uiteindelijke fysiologische verschijnselen. Dit maakt dat elk nieuw Mab opnieuw *in vivo* getest moet worden.

Mab's van humane oorsprong

Tot nu toe zijn we uitgegaan van monoclonale antilichamen van muize- of ratte-oorsprong. Deze zijn in rhesusapen maar ook in mensen zeer immunogeen, waardoor hun toepassing beperkt is. De meest voor de hand liggende methode om dit probleem te voorkomen is het maken van Mab's van humane oorsprong. De lijdensweg die studies in deze richting hebben moeten doorlopen illustreert nog eens te meer de trouwvaille van Köhler en Milstein. Het is goeddeels onmogelijk gebleken om een stabiele fusielijn te verkrijgen van menselijke plasmacytoomcellen. De weinige enthousiaste berichten die in de literatuur zijn verschenen, zijn alle een zachte dood gestorven. Daarbij komt nog dat het niet eenvoudig is om mensen te immuniseren met antigenen naar keuze en dat men afhankelijk is van moeizame procedures als *in vitro* immunisaties of op zoek moet gaan naar een persoon of patiënt met een natuurlijke antilichaamrespons tegen het gewenste antigeen. Deze zijn lang niet altijd voorhanden en mochten ze er zijn, dan is perifeer bloed niet de meest geëigende bron van geactiveerde B-cellen.

De meest gebruikte methode voor het verkrijgen van humane Mab's is het transformeren van B-cellen door middel van Epstein Barr virus (EBV). EBV transformanten blijken in praktijk vaak instabiel te zijn, waarschijnlijk omdat het virus vooral stadia van B-cellen laat uitgroeien waarin de somatische 'generator of diversity' nog niet is afgeschakeld. Dit laat zich soms bewerkstelligen door de jonge transformant te fuseren met een hulp-fusielijn van gemengde muize- en mense-oorsprong.

Recombinant-DNA-technieken

Een geheel andere benadering gaat uit van de veronderstelling dat antigeenbindingsplaatsen van muizen en mensen in principe chemisch niet van elkaar verschillen. door middel van recombinant-DNA technieken worden de hypervariabele delen van muize-Mab's gewisseld met die van een niet-gerelateerd menselijk immunoglobuline. Resultaat is een menselijk immunoglobuline molecuul met daarin een muize-antigeenbindingsplaats. De namen van Winter en Rees zijn onverbrekelijk verbonden met deze uiterst verfijnde techniek, die langzamerhand gemeengoed is geworden in bedrijfslaboratoria. De investering in geld en tijd die nodig is voor het construeren en valideren van dit type Mab's blijkt alleen te genereren te zijn als er een direct commercieel belang aan de horizon ligt. Het ligt voor de hand dat dit alleen geldt voor reagentia bestemd voor therapeutische toepassing bij relatief grote groepen patiënten. Om effectiviteit en toxiciteit te meten wordt regelmatig een beroep gedaan op de chimpansees van het ITRI.

In vrijwel alle voorbeelden die ik u tot nu toe gegeven heb, wordt gebruik gemaakt van de fysiologische immuunresponse om voldoende B-cellen met een gewenste specificiteit te genereren. In hoogmoed hebben moleculair biologen ook dit stukje natuur terzijde geschoven en zijn zij begonnen om DNA-banken te maken van het gehele immunologische repertoire van de muis en de mens. Vervolgens moet het in theorie mogelijk zijn om de gewenste DNA-sequenties te selecteren die voor een gewenst antilichaam coderen. Vervolgens kan men deze sequenties in een geschikte microbiële gastheer tot expressie brengen en verkrijgt men een volledig schoon product. Aan de theorie kleven drie bezwaren: (1) in principe pikt men met deze methode variabele gedeelten van lichte en zware ketens apart op. Om een echt antilichaam te maken, moeten deze worden gecombineerd. Het is ondoenlijk om alle mogelijke combinaties te testen, (2) er wordt geen gebruik gemaakt van het natuurlijke verschijnsel van de affiniteitsmaturing, waardoor relatief veel laag-affiene clones worden verkregen en (3) voor een fatsoenlijk antilichaam is glycosylering onontbeerlijk en leveren bacteriën als gastheer een vrijwel onbruikbaar produkt. Winter en Milstein concluderen in hun overzicht in *Nature* van afgelopen januari dat de moleculair bioloog nog niet in staat is het natuurlijke selectieproces na te doen, laat staan te verbeteren. De geïmmuniseerde muis, en in uitzonderingsgevallen de hyperimmune mens, zal nog lang nodig blijven om de optimale $V_L - V_H$ combinatie te vinden.

Gaan we uit van een antigeen-gestimuleerde B-cel, die we op de één of andere wijze zuiver in handen hebben gekregen, dan is het wel goed mogelijk om de genetische informatie voor dat specifieke antilichaam te vermenigvuldigen en de variabele gedeelten te plaatsen in een standaard 'ontvanger-cel'. Die variabele gedeelten kunnen

dan verbonden worden met een constant gedeelte van een gewenste zware keten klasse of bijvoorbeeld met een gen dat codeert voor een toxische stof. Het zuiver in handen krijgen van een specifieke B-cel is praktisch niet zo eenvoudig. Op dit moment is het fuseren van een verzameling B-cellen met een plasmacytomecellijn waarschijnlijk nog het eenvoudigste.

Een zeer recente en veelbelovende ontwikkeling voor diagnostische toepassingen is het nog verder uitkleden van het antilichaam. We moeten dan teruggaan naar de essentie van de eiwit-eiwit interactie die ten grondslag ligt aan de antigeen-antilichaam interactie. Die interactie komt tot stand door optelling van verschillende aantrekkende krachten tussen, in de ruimte, tegenover elkaar liggende aminozuren of andere bouwstenen. Hiervan uitgaande zijn door de groep van Lerner bacteriofagen geconstrueerd die op basis van random mutatie vrijwel elke denkbare combinatie van circa 8 aminozuren tot expressie brengen. Zeer ingenieus worden de fagen met een stukje eiwit, dat bindt aan het gewenste antigeen, verzameld en opgegroeid in bacteriën. Hoewel de techniek nog verre van volmaakt is, kan zij een revolutie betekenen voor de diagnostiek.

Alternatieve produktiemethoden en -organismen

De meeste monoclonale antilichamen worden nog geproduceerd met zoogdiercellen. Biotechnologisch gezien zijn zoogdiercellen een horreur: ze groeien langzaam, stellen zeer hoge eisen aan hun kweekomstandigheden, kunnen niet in hoge dichtheden gekweekt worden en verkwisten in vergelijking met microorganismen veel te veel energie aan hun eigen celhuishouding, in plaats van die te besteden aan de productie van het gewenste produkt. Experimenten met bacteriën als productie-organismen zijn tot nu toe beperkt gebleven tot de aanmaak van kleine onderdelen van antilichamen. Hun onvermogen tot glycosylering is de belangrijkste hinderpaal. Mogelijke oplossingen worden gezocht in het gebruik van schimmels als gastheer voor Ig-genen. Een Mab-producerende schimmel zou wel eens de finale oplossing kunnen vormen voor de grootschalige productie van Mab's.

De grootschalige productie is een verhaal apart. Oorspronkelijk werd veelal gebruik gemaakt van de tumor-oorsprong van de (muize) Mab-cel en werden grote hoeveelheden ascitesvloeistof verzameld van muizen die intraperitoneaal tumorcellen kregen toegediend. De mogelijke contaminatie van het Mab met eiwitten en/of virussen van muize-oorsprong en een veranderende ethiek heeft de populariteit van de ascitesproductie danig doen afnemen. De 'Code of Practice' van de Veterinaire Hoofdinspectie, Sectie Dierproeven verbiedt feitelijk de grootschalige productie door middel van de inductie van ascites. Alternatieve *in vitro* productie is in principe goed

mogelijk maar vereist aanzienlijke kennis en investeringen. Zij is daarom voorbehouden aan gespecialiseerde bedrijven en bedrijfjes. Het lijkt me niet zinvol om op dit moment uitvoerig in te gaan op de voor- en nadelen van de verschillende systemen die in zwang zijn. Het moge genoeg zijn dat alle betrokkenen het erover eens zijn dat een microbiële gastheer veruit de voorkeur verdient boven een zoogdiercel.

Dames en heren, ik heb slechts een zeer beperkte greep in de doos van Pandora gedaan. Als we de deksel verder zouden openen, komen daar nog een groot aantal variaties uit die in de toekomst van belang kunnen worden voor de medisch-biologische wetenschap. Een voorbeeld zijn de 'switchvarianten' waarbij gebruik wordt gemaakt van het verschijnsel dat ook Mab-producerende cellen nog in staat zijn van isotype te veranderen. Het vereist speciale technieken om deze zeldzame varianten te selecteren en uit te doen groeien tot een stabiele populatie van cellen. De cellsorter speelt hierbij een belangrijke rol. Er zijn grote verwachtingen op dit gebied nu een supersnelle sorter gebaseerd op het laserkanonprincipe in Rijswijk zijn voltooiing nadert. Switchvarianten zijn interessant omdat fysiologische functies van antilichamen vooral verbonden zijn met het isotype. Ik noem daarbij complementbinding en de binding aan de verschillende Fc-receptoren. Switchvarianten geven een beetje de richting aan waarin de immunotechnologie zich beweegt: de wetenschap legt zich niet langer neer bij wat de natuur geeft, maar gebruikt het Mab als uitgangspunt om vervolgens de 'impossible antibodies' te gaan maken.

De kreet 'impossible antibodies' komt van één van de grotere Amerikaanse firma's die zich op deze markt hebben gestort. Een mooi voorbeeld van 'impossible antibodies' zijn de bispecifieke antilichamen, voor het eerst beschreven door Milstein en medewerkers. Een normaal antilichaam is symmetrisch en heeft twee identieke antigeenbindingsplaatsen. Door twee Mab-producerende cellen te fuseren is het in principe mogelijk om antilichamen te krijgen waarvan de ene helft de ene, en de andere helft de andere specificiteit draagt. Aangezien de specificiteit van een antigeenbindingsplaats normaliter door een combinatie van hypervariabele gedeelten van zware en lichte ketens wordt gegeven, stelle men zich voor dat een zware en een lichte keten van de ene Mab-ouder recombineert met een stel van de andere ouder. U kent de zegswijze van de duivel en de hoop. In het eerste artikel van Milstein werd een verrassend hoge proportie gevonden van heterologe recombinatie tussen homologe gecombineerde zware en lichte ketens. In plaats van de verwachte 6 % opbrengst aan bispecifieke antilichamen (1/16 gedeelte van de mogelijke permutaties) werd in de orde van 50% opbrengst verkregen. Gewone stervelingen hebben meestal minder geluk. Ik had het voorrecht een bispecifiek Mab-project te mogen meebegeleiden, dat geïnitieerd was door collega Bast van de Rijksuniversiteit Utrecht. Het kostte veel

inventiviteit om de gewenste bispecifieke specificiteit te zuiveren uit de overmaat aan ongewenste recombinanten.

Bispecifieke antilichamen hebben potentieel een groot aantal toepassingen. Voor de hand ligt het construeren van een antilichaam dat aan de ene kant een bepaald antigeen herkent aan de andere kant bijvoorbeeld een enzym. Men kan zich dan bijzonder bruikbare dubbelkleuringen voor de diagnostiek voorstellen. Een andere mogelijkheid is het gebruik van bispecifieke antilichamen om twee celoppervlakte-antigenen te aggregeren waardoor de specificiteit van een cytotoxische reactie vergroot zou kunnen worden. Sommige tumorcellen laten zich goed karakteriseren door de combinatie van twee oppervlaktemerkers die ieder voor zich een wijde verspreiding bezitten. Weer een andere mogelijkheid is het gebruik van bispecifieke antilichamen om cytotoxische T-cellen geforceerd in contact te brengen met bepaalde doelwitcellen. Het blijkt dat een antilichaambrug tussen deze twee cellen, de natuurlijk aanwezige schroom van T-cellen om lichaamseigen cellen te doden kan doen overwinnen. De groep van collega Bolhuis maakt goede vorderingen om dit principe klinisch toe te passen. Het einde van de 'impossible antibodies' is nog lang niet in zicht. Het is een terrein waar de technisch geïnteresseerde immunoloog zijn hart nog kan ophalen.

De vooruitzichten van de immunotechnologie

De immunologie ontwikkelt zich snel. Meer en meer raakt bekend over de signaalketens die er voor zorgen dat het immuunsysteem adequaat - niet te weinig en niet teveel - reageert op externe en interne stimuli. Veel van die inzichten zijn verkregen met *in vitro* experimenten en wachten nog op een bevestiging *in vivo*. De immunotechnologie zal eraan bijdragen de fysiologische betekenis van receptor-ligand interacties te ontrafelen. Daarvoor zal het nodig zijn methoden te ontwikkelen waarmee lokale concentraties van signaalmoleculen kunnen worden vastgesteld en zal de stap van het meten van associatie ('binding') naar het meten van herkenning (binding met fysiologische betekenis) gemaakt moeten worden. Uiteindelijk zal men dit type vragen alleen kunnen beantwoorden in een volledig homoloog systeem waarin geen verwarring kan ontstaan door antilichaamreacties tegen het gebruikte ligand. Dit vereist dat soortvreemde delen van het molecuul worden uitgewisseld tegen soorteigen delen. De recombinant-DNA-technieken bieden hiertoe mogelijkheden. Het gericht ingrijpen in verstoorde signaalketens tijdens bepaalde ziekteprocessen zal een steeds belangrijker onderdeel van de immunotechnologie worden. Hierbij zal enerzijds gebruik gemaakt worden van (gehumaniseerde) Mab's, anderzijds van cytokinen.

In deze rede hebben antilichamen een overheersende rol gespeeld. Dit heeft vooral te maken met mijn eigen opleiding en interesse. Het wil niet zeggen dat de andere arm van het immuunsysteem zich minder in de belangstelling van de immunotechnologie zou mogen verheugen. De T-cel immunologie heeft echter de handicap dat het een stuk moeilijker is om een bepaalde specificiteit te cloneren en in monocultuur te brengen. T-cel clones hebben een weelde aan informatie opgeleverd over de mogelijkheden van T-cellen *in vitro*. De toepassingen *in vivo* zijn nog beperkt te noemen.

De immunotechnologie als toegepaste wetenschap

De immunotechnologie is een typisch voorbeeld van toegepaste wetenschap. Klanten zijn enerzijds de fundamentele wetenschappers die voorzien moeten worden van geoptimaliseerde technieken en reagentia en aan de andere kant de bedrijven die immunologische diagnostiek of therapie tot hun markt rekenen. De markt voor immunologische reagentia wordt door sommigen als de markt van de komende decennia gezien en het is daarom misschien goed vanaf deze plaats stil te staan bij de relatie tussen academie, industrie en de mogelijke rol van een organisatie voor toegepast wetenschappelijk onderzoek als TNO.

De immunotechnologie vormt een interface tussen wetenschap en praktijk. Die interfacefunctie kan geen passief doorgeven van kennis zijn: er bestaat in de immunologie nog steeds een 'afgrond van onbegrip' tussen academische wetenschappers, klinici en vertegenwoordigers van het bedrijfsleven waar het gaat om het geschikt maken van een laboratoriumreagens of -techniek voor klinische of algemene toepassing. Tussen 'bench' en 'bed' zit een lang traject van produktontwikkeling, waarvoor belangrijke investeringen in kennis en geld noodzakelijk zijn. Om een voorbeeld te geven: het klakkeloos verspreiden van Mab's zonder zeer gedegen produktinformatie (met name voor wat betreft de systemen waarvoor de Mab's zijn gevalideerd) heeft reeds voor meerdere teleurstellingen en waarschijnlijk ook voor een flinke hoeveelheid misinformatie gezorgd.

Aan de Medische Faculteit wil de immunotechnologie zich richten op het verder valideren van immunologische technieken zowel voor diagnostiek als therapie. Daarbij zal vanuit het Instituut Immunologie intensief worden samengewerkt met die afdelingen binnen de Faculteit en hopelijk ook die binnen het Academisch Ziekenhuis, waar de immunologische techniek niet de primaire invalshoek is. Voorts zal door middel van de immunotechnologie de brug versterkt kunnen worden tussen de Medische Faculteit en het Instituut voor Toegepaste Radiobiologie en Immunologie (ITRI-TNO). De vele samenwerkingsverbanden die reeds bestaan zullen kunnen

worden uitgebouwd. Daarbij zal de Faculteit er zeker op gewezen worden welke unieke mogelijkheden de primatenkolonie van het ITRI biedt voor biomedisch onderzoek.

Aan de interface tussen universiteit en bedrijfsleven valt op het terrein van de immunologie nog veel te verbeteren. Deze interface heeft momenteel een ad hoc en geen structureel karakter. Dit betekent dat zeer veel kennis wordt ontwikkeld waarvoor later geen toepassing blijkt te bestaan. Men kan dit opvatten als een natuurlijk gevolg van de rol van de universiteit als generator van kennis ten behoeve van het onderwijs. Anderzijds breekt bij de universiteit ook het begrip door dat het bedrijfsleven een rol te spelen heeft in het verspreiden en ten nutte maken van academische 'produkten'. Ook hier kunnen Mab's als voorbeeld dienen: het is langzamerhand vanzelfsprekend dat een goed Mab verspreid wordt door het bedrijfsleven. Deze verspreiding dient de maatschappij en daarmee de wetenschap en past niet binnen de organisatie van de universiteit. Kent de universiteit een belang toe aan het verspreiden van kennis en ziet zij daarbij een rol weggelegd voor het bedrijfsleven, dan ontstaat de vraag in welk stadium van de produktontwikkeling het bedrijfsleven betrokken wordt. In praktijk blijkt dit moment vrijwel altijd te laat en dus verkeerd gekozen te worden. Een aantal ondernemende wetenschappers heeft de weg naar het bedrijfsleven gevonden en biedt 'kant-en-klare produkten' aan. Niet verwonderlijk toont het bedrijfsleven zich uiterst kieskeurig en moet de universitaire onderzoeker blij zijn met een marginale tegemoetkoming in de onkosten. Dit is een direct gevolg van het ontbreken van 'commitment' aan de kant van het bedrijfsleven. Hierbij moet aangetekend worden dat de kosten die gemaakt moeten worden om een Mab klaar te maken voor toepassing niet onaanzienlijk zijn. Dit geldt in overtreffende trap als het Mab genetisch moet worden gemanipuleerd (met als beste voorbeeld het 'humaniseren' van muize-Mab's voor therapeutische toepassingen in mensen). De investeringen die hiermee zijn gemoeid, maken het voor de universiteit vrijwel onmogelijk om hierin een belangrijke rol te spelen.

Nederland kent slechts weinig industrieën die zich speciaal op het commercialiseren van immunologische produkten richten. Hiermee dreigt Nederland in een ernstige achterstandspositie te geraken en wordt er bijzonder veel kennis geproduceerd die niet geabsorbeerd wordt, ofwel naar het buitenland afvloeit. Om deze schadelijke ontwikkeling te keren is een gezamenlijke inspanning nodig van universiteit, bedrijfsleven en overheid. De universiteit zal zich méér dienen open te stellen voor de beïnvloeding van het bedrijfsleven en zal daartoe een actief marketingbeleid moeten ontwikkelen. Het bedrijfsleven zal niet achteruit kunnen blijven zitten. Het zal moeten gaan participeren in het risicodragende gedeelte van het onderzoek, zodat dit niet meer volledig ten laste van de universiteit komt. De overheid tenslotte zal moeten inzien dat de immunotechnologie belangrijk kan gaan bijdragen aan het economisch verkeer.

Zij zal initiatieven actief moeten steunen om tot uitbating van het (universitair) (bio)medisch onderzoek te komen en zal op moeten houden de bal rond te spelen van O&W naar WVC naar EZ en weer terug. Zeer urgent is hierbij de steun aan kleinere bedrijven. Steeds meer onderzoeksresultaten komen uitsluitend ten goede aan grote bedrijven met een eigen onderzoekscultuur. Traditioneel behoren die bedrijven niet tot de meest innovatieve. Internationaal kenmerkt Nederland zich door het vrijwel ontbreken van jonge 'hi-tech' bedrijven en door het ontbreken van technologische innovatie op de politieke agenda. Andere landen zijn Nederland ver vooruit bij het scheppen van voorwaarden waaronder wetenschap, technologie en economische bedrijvigheid hand in hand kunnen gaan. Dat Nederland ongeveer als enig land in Europa geen minister voor Wetenschap en Technologie bezit, moge een teken aan de wand zijn.

TNO-Gezondheidsonderzoek is in het proces van de vermaatschappelijking van de biomedische wetenschap de natuurlijke partner van de universiteit. Zij putten beide uit dezelfde bron van kennis. De universiteit ten behoeve van hoog-kwalitatief onderwijs, TNO ten behoeve van de steun aan het economisch en maatschappelijk verkeer. *Qualitate qua* heeft de medische faculteit een zeer breed onderzoeksterrein. De kracht van TNO moet liggen in het beperken van zijn onderzoeksinspanning tot gebieden met grote toegepaste waarde. In het licht van belangrijke veranderingen in de opvattingen ten aanzien van de rol van de overheid - te karakteriseren als een verandering van kwaliteits- en verantwoordelijkheidsdenken naar resultaatdenken - zullen universiteit en TNO(-Gezondheidsonderzoek) zich op hun kerntaken en maatschappelijke rol moeten herbezinnen. De immunotechnologie kan hierbij een voorbeeldfunctie vervullen en ik hoop daaraan mijn bescheiden bijdrage te mogen leveren.

Dankwoord

Dames en heren, in deze rede heb ik reeds een aantal personen genoemd die in mijn post-universitaire loopbaan van bijzonder belang zijn geweest. Ik ben hen allen dank verschuldigd. Speciaal wil ik hierbij Rob Benner noemen. Onze eerste contacten stammen uit begin 1973, toen we samen op een immunologiecursus zaten hoog in de bergen van Roemenië. Sindsdien hebben we samengewerkt. Eerst intensief, later op wat meer afstand. Ik ben er trots op deel te mogen uitmaken van het Instituut Immunologie.

Mijn dank gaat ook uit naar het bestuur van het Lorentz-Van Itersonfonds dat de bijzondere leerstoel Immunotechnologie vestigde en het College van Bestuur van de

Erasmus Universiteit dat mij, op voordracht van het Faculteitsbestuur en de Faculteitsraad, waardig achtte deze stoel te bezetten.

Medewerkers van het ITRI. Soms heb ik de neiging in de gospel 'We shall overcome' te vervallen. Toen ik Dick van Bakkum opvolgde heb ik me heilig voorgenomen hem niet te willen evenaren. Laat dat genoeg zijn. De metaforen waarmee ik U heb bestookt, spraken steeds van wilde baren, stormballen die gehesen werden, en wat dies meer zij. Het ITRI is één van de mooiste instituten dat er is. Over anderhalve week strijden we verder.

Medewerkers van TNO-Gezondheidsonderzoek en in het bijzonder de hoofddirecteur en leden van het directieteam. Verwijzend naar een recente notitie ten behoeve van ons overleg: 'ik geloof erin'.

Mijn vader en moeder wil ik bedanken. Ik ben geen psycholoog, maar zelfs ik herken de draad die nu verder gesponnen wordt. Ook mijn schoonmoeder wil ik in dit dankwoord betrekken. Zelfs in hele moeilijke tijden heeft zij een niet aflatende interesse getoond in het werk waarmee ik bezig was.

Tenslotte lieve Joan. Dit was de zoveelste aanslag op onze tijd en langzamerhand geloof ook ik niet meer dat het binnenkort rustiger zal worden. Laten we de doos van Pandora nu maar even dichtdoen.

Ik heb gezegd.